



**Opponensi vélemény dr. Fekete Andrea „Új molekuláris mechanizmusok és terápiás lehetőségek a diabéteszhez társuló sokszervi szövődmények kezelésében” című MTA doktori értekezéséről**

Jelölt részletes bevezetésében rendkívül precízen előkészíti későbbi mondanivalóját. Áttekinti a cukorbetegség, a cukorbetegség okozta vesebetegség, a depresszió, az iszkémia-reperfüzió klinikai, majd ezek elméleti alapvetéseit. Igazi transzlációs megközelítéssel a betegről az intracelluláris jelátvitelig terjed a bevezetés spektruma. Ez impresszionáló!

**Formai vélemény**

Jól használja a klinikai és az alapkutatói szaknyelvet, az elütések és a nyelvtani tévedések előfordulása elenyésző. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy az ábrák egy része csak nehezen volt látható, amikor egyharmad oldalon 8 immun-hisztokémiai ábra és csatlakozó 8 oszlopdiagram került bemutatásra.

**Tartalmi vélemény a megjelenés sorrendjében:**

A 16. oldalon a 3. bekezdésben jelölt azt írja, hogy „A DM a lakosság közel 10%-át érinti;...”. Az a szerencsés helyzet állt elő az utóbbi években, hogy a hazai cukorbeteg népesség epidemiológiájáról részletes, tudományos felmérések készültek (DIAB-EPI vizsgálatok: Diabetes Res Clin Pract. 2020 May;163:108134., Arch Med Sci. 2019 Oct 7;16(1):34-41., Diabetes Res Clin Pract. 2019 Sep;155:107788., Diabetes Metab Res Rev. 2019 Nov;35(8):e3190., Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Mar 21;10:170., Diabetes Ther. 2018 Oct;9(5):2133-2141., Cardiovasc Diabetol. 2018 Jul 27;17(1):107., stb.). Ezek alapján pontos számok adhatók meg nem csak az egyes cukorbetegség formák magyarországi előfordulásáról, de a szövődmények időbeli alakulásáról is. Sajnálatos, hogy ezek egyike sem szerepel a hivatkozások között. Ugyanez vonatkozik a 17. és 18. oldalon leírtakra is, ami a halálozást és a pénzbeli ráfordítást illeti.

A 19. oldalon található 1. táblázatban a T2DM oka leegyszerűsítve szerepel és csak az inzulin-rezisztencia kerül megemlítésre. Ez mellett még számos oki tényező felsorolható, az inzulin-szekréció károsodásától az SGLT-2 enzim vesebeli fokozott expressziójáig.

A 20. oldalon kimaradt a prediabetes-diagnózis felállításának HbA<sub>1c</sub>-re alapozott módszere.

A 27. oldalon a BDNF jelátvitelét láthatjuk a 4. ábrán. A BDNF jelátvitelének közös pontja az inzulinnal (és még egyébként számos más hormonnal is) az IRS1/2-Akt aktivációja. Az inzulin-rezisztenciáról tudjuk, hogy az az IRS1/2 szintjén alakul ki, foszforilációs zavar miatt. Létezik-e BDNF-rezisztencia az említett jelátviteli eltérések miatt?

A 31. oldalon a DKD mint krónikus veseelégtelenségi (KVE) ok szerepel és ez a fogalom keveredik a krónikus vesebetegség (CKD) terminológiájával. Fontos tisztázni, hogy minden cukorbetegség okozta vesekárosodás esetén CKD-ről (vagy diabeteses vesebetegségről, DKD-ről) beszélünk, és az új terminológia szerint végállapotú vesebetegségről (end stage kidney disease, ESKD) lehet szó veseelégtelenségben.

Ehhez hasonlóan megváltozott a terminológia az albuminuria tekintetében is, kerülendő a mikro-, makroalbuminuria és helyette a kóros albuminuria javasolt. A 33. oldalon a kóros albuminuria küszöbértéke helytelenül szerepel (<30 mg/24 óra), valójában >30 mg/24 óra. A következőket „albuminúriának” írt fogalom, helyesen „albuminuria”.

A bevezetésben nem kapott kellő szerepet a DKD legfontosabb markere, a becsült GFR (bGFR), amire jelenleg a leggyakrabban alapozzuk a DKD diagnózist, tekintettel arra, hogy a RAAS-gátlás általánossá válása miatt, a DKD-s betegek nagyobb részének normális az albuminürítése. Ezért a ma elfogadott definíció szerint bGFR < 60 ml/perc/1,73m<sup>2</sup> és/vagy kóros albuminürítés esetén beszélünk DKD-ről.

Jelölt kiváló alapossággal és kellő részletességgel tárgyalja a DKD patogenezisét (34-42. oldalon), némi hiányérzetet kelt azonban az, hogy hiányzik az oxidatív stressz központi szerepének részletezése (egyedül a 10. ábrán kerül megemlítésre, ahol szintén látható ennek centrális helyzete).

A DKD kezelése fejezetben (42-44. oldal), helyesen, említésre kerülnek az SGLT-2-gátlók is, de mint „Új szerek kísérleti fázisban a DKD terápiájában”. Az SGLT-2-gátlók azonban már a 2019-es ADA/EASD és a 2020-as MDT-ajánlásban is bizonyítottan kedvező DKD-kockázatsökkentő szerekként kerültek javaslatra. Így tehát az SGLT-2-gátlók DKD-hatása már nem kísérletes fázisú, legalább 2019 óta.

Vitatható a disszertáció ama megállapítása, hogy a DKD-s betegek vesepótló kezelése már 30 ml/perc/1,73m<sup>2</sup> esetén megindítható lenne (44. oldal második bekezdés).

Az iszkémia-reperfúzió leírása során taglalja a citoprotektív mechanizmusokat (48-50. oldal).

Kitér az NO szerepére is, sajnálatos módon, azonban kimarad az iszkémia körülményei között is érintetlen és működőképes kénhidrogén (H<sub>2</sub>S) bemutatása, pedig ennek jelentősége már 2009-ben felmerült (J Am Soc Nephrol. 2009 Sep;20(9):1901-5.) és a vese-transzplantációval is kapcsolatba hozták.

Jelölt a hiperglikémia in vitro modellezésére (53. oldal) 35 mmol/l-es glukóz-koncentrációt használt. A szokványos koncentráció a 15, vagy 25 mmol/l. Miért döntöttek ez mellett az extrém magas érték mellett? Végeztek-e glukóz-koncentráció függési vizsgálatot?

Más modelleket is használtak, mint pl. a streptozocin-diabetest, az iszkémia-reperfúzió, a vese autotranszplantációs és a vese hideg iszkémiás modellt.

Vizsgáló módszereik (két-foton mikroszkópos mérések, SPECT-MRI-vizsgálatok, viselkedésteztek, ELISA-mérések, hisztológiai, immunhisztokémiai, molekuláris biológiai vizsgálatok) modernnek, a kitűzött célok elérésére alkalmasak voltak.

Eredményeit 11 nagy nemzetközi elismertségű, magas impact factor-ral rendelkező folyóiratban közölte, amely közleményekben első, vagy utolsó szerző volt.

Az eredmények ismertetését a diabetes és depresszióval foglalkozó adataival kezdi. Nem teljesen logikus a sorrend, mert a módszerek fejezetben a DKD-modell leírásával indított. A szigma-1-receptoragonista fluvoxamin a disszertáció metodikai részében kellően jellemzett molekula, amit nem lehet elmondani a NE100, szigma-1-receptor szelektív antagonistáról. Szerencsés lett volna néhány mondatban ezt megtenni arra való tekintettel, hogy több fejezetben is kiterjedten alkalmazta.

A diabetes a szigma-1-receptor-brain-derived neurotrophic factor rendszer fehérjeszintjeinek csökkenését okozta az agyban, amit a fluvoxamin megfordított és amely hatást az NE100 gátolt, de az mRNS szintjén ennek nem volt nyoma. A fehérjékben látott változásokkal parallel eredmények voltak láthatók a funkcionális vizsgálatokban is. Jelölt véleménye ezzel kapcsolatban az, hogy a fehérjék poszt-transzlációs módosulásai állhatnak a háttérben. Felmerül a kérdés, hogy milyen változásokra gondol?

Ebben a modellben (STR-diabetes) az agyban, a lozartán fluvoxamin-szerű fehérjehatást vált ki (82. oldal, 29. ábra). Felmerül a kérdés, hogy az mRNS-szinteket vajon mérték-e, és ha igen, abban volt-e változás lozartán hatására?

Nagy jelentőségű megfigyelés az, ami a RAAS-gátlás és a csökkenő depresszió-kockázat közötti lehetséges kapcsolatra hívja fel a figyelmet. Szép alapkutatási adatokkal támasztja alá hipotézisét, amelyek arra utalnak, hogy a RAAS-gátlás ezt a kedvező hatását a gyulladás csökkentésén keresztül fejt ki. De vajon más gyógyszerek, amelyek ugyanígy a szisztémás szubklinikus gyulladás mérséklését okozzák, mint pl. a statinok, vagy az alacsony dózisu aspirin, létrehoz-e hasonló hatást? Lehetséges-e ezek és az antidepresszánsok közötti addíció a depressziót illetően?

A DKD-kezelésével foglalkozó munkáinak RAAS-gátlással kapcsolatos része jól bemutatja a RAAS-gátlók kedvező antifibrotikus vesehatását. A diabeteses modellben lecsökkent a foszfo-eNOS/eNOS arány, de nem változott a foszfo-Akt/Akt hányados (101. oldal, 51. ábra). Ez arra utal, hogy stimulálatlan esetben az Akt-eNOS jelátvitelnek nincs jelentősége diabetesben, de vajon hormon-stimuláció esetén mi lehet a helyzet? Történt-e pl. inzulin-stimuláció? Itt felmerül egy alapvető hibája a STR-diabetes T1DM modellnek. Amennyiben inzulinnal nem szupplementáljuk az állatokat, gyorsan elpusztulnak. Amennyiben inzulint adunk már nem csak hiperglikémiás a modell, hanem hiperinzulinémiás is, hiszen az inzulint szubkután adjuk. Ha az inzulin-adagolás intraperitoneálisan történt, az már egy kicsit fiziológiásabb. Mi és hogyan történt jelölt modell-kísérletei során?

Hasonló a kérdésem a Na-K-ATP-ázról is. A Na-K-ATP-áz enzim az intracelluláris, citoszolikus kompartmentből az inzulin hatására kerül a sejtmembránba és itt fejt ki iontranszport-hatását. Tehát, hogyan viszonyult a Na-K-ATP-áz vizsgálat a diabetes modellhez? Történt-e inzulinkezelés és ha igen, akkor az hogyan viszonyult a 102. oldalon, az 52. ábrán látható eredményekhez?

A dapagliflozinnal végzett vizsgálatok különösen látványosak és elkészülésük idején úttörő jelentőségűek voltak. Kiemelendők a tubuláris károsodást mutató markerek (KIM-1, NGAL) kedvező változásai (105. oldal, 55. ábra), amelyek igazolják a dapagliflozin tubuláris védő hatását, amit a klinikum a mai napig nem értékel kellőképpen.

Remekül egybevághat a klinikumban tapasztalt, az SGLT-2-gátlókezelés kezdetén észlelt eritropoetin-emelkedéssel a 109-oldalon található 60. ábra mondanivalója. A klinikumban azonban az eritropoetin-szint emelkedése csak az SGLT-2-gátlókezelés első periódusában

észlelhető, utána az eritropoetin-szint visszatér a kiindulási értékére, ellenben a hematokrit-emelkedés változatlan marad, változatlan hemodinamikai viszonyok (volumenstátusz) mellett. Hogyan illeszthetők be ezek a klinikai tapasztalatok az alapkísérleti modelljébe?

A következő részben a szigma-1-receptor szerepét vizsgálta DKD-ban (110-114. oldal). Kimutatta, hogy a szigma-1-receptort a proximális tubuláris epitélisejtek és a renális fibroblasztok is expresszálják. Ezek után megvizsgálta, hogy a szigma-1-receptor-agonista fluvoxamin hogyan befolyásolja a vesekárosodást. Igazolta, hogy a fluvoxamin javította a vesefunkciót, csökkentette a mezangiális mátrix túltermelést és a renális fibrózist. Felmerül a kérdés ezek alapján, hogyan befolyásolja a fluvoxamin a mezangiális mátrix expanzóját, ha a szigma-1-receptor nem expresszálódik a glomerulusban, csak a tubuláris sejtekben?

A munkacsoport korábbi munkáit folytatva, vizsgálták a nemi különbségek hatását az iszkémia-reperfüziós vesekárosodásra. Ismét azt találták, hogy a nőstény patkányok ellenállóbbak voltak erre a károsító tényezőre a vesefunkció és a –szövetten tekintetében is. A háttérben magasabb szigma-1-receptorfehérje-, nagyobb foszfo-Akt- és Na-K-ATP-áz-szintet találtak a nőstényekben. Kérdésem az lenne, hogy lehet-e direkt összefüggés a női nemi hormonok, magasabb szigma-1-receptorfehérje-szint és az Akt-foszforiláció, valamint a megtartott Na-K-ATP-áz fehérjeszint között, amint azt a bevezetésben a jelölt sugallta? Továbbá felmerül-e annak lehetősége, hogy az antikoncipiens-kezelés ezt befolyásolhatja? Amennyiben igen, milyen irányú a változás antikoncipiens hatására?

Látva a szigma-1-receptor és az inzulin-receptor intracelluláris jelátvitelének közös vonásait (Akt) és ismerve az inzulin-jelátvitel zavarát oxidatív stressz hatására (inzulin-rezisztencia), felmerül a kérdés, hogy létezik-e szigma-1-receptor jelátviteli-zavar, azaz szigma-1-receptor-rezisztencia?

Jelölt világos eredményei utalnak az oxidatív stressz klasszikus példjaként kezelt iszkémia-reperfüzióban a fluvoxamin renoprotektív hatására (120 oldal, 69. ábra, 121-122 oldal 70. ábra). A kísérleti elrendezés szerint itt fluvoxamin előkezelés (az iszkémia-reperfüziós károsodás előtti) történt. Felmerül a kérdés, hogy kialakul-e fluvoxamin-rezisztencia az iszkémia-reperfüzió hatására, azaz hogyan változik a fluvoxamin hatékonysága, ha az iszkémia-reperfüzió **közben** adjuk? Ennek nyilván nincs jelentősége a transzplantáció során, hiszen szigma-1-receptor agonistával elő lehet kezelni, de fontos lehet a natív, in situ vese iszkémiás károsodása után.

A disszertáció részletesen foglalkozik az NO és az iszkémia-reperfúziós károsodás kapcsolatával és arra a megállapításra jut, hogy a fluvoxamin részben az Akt-eNOS-NO-vazodilatáció útvonalon keresztül renoprotektív lehet az iszkémia-reperfúziós károsodásban és így a transzplantáció során is. Felmerül azonban az a nehézség ezzel a magyarázattal kapcsolatban, hogy iszkémiában az oxigénhiány miatt sem az NO, sem a CO nem termelődik normális mennyiségben, reperfúzióban pedig a fokozott szuperoxid szabadgyök-képződés miatt, a termelődött NO a szuperoxid szabad gyökkel peroxinitritet képez, ami vazokonstriktor. Ismert viszont, hogy hipoxiában a H<sub>2</sub>S-útvonal intakt marad és átveszi az NO-CO-útvonal vazodilatációs szerepét. Van-e arra adat, hogy a fluvoxamin hogyan befolyásolja a H<sub>2</sub>S képződését?

A fluvoxamin hatásának komplex voltát bizonyítják azok az adatok is, amelyeket a jelölt a „Megbeszélés” részben említ, és amelyek szerint a fluvoxaminnak vércukoremelő és hipoglikémizáló hatása is lehet (131. oldal 4. bekezdés). Jelátviteléből kiindulva (Akt aktiváló hatását figyelembe véve, amely az inzulin-jelátvitelében is szerepel és döntő az inzulin vércukorcsökkentése szempontjából) inkább hipoglikémizálónak kellene lennie. Hogyan látja ezt a kérdést a jelölt?

A mineralokortikoid-receptor-blokkolókat illetően (135-136. oldal) újabb vizsgálat (FIDELIO-DKD) igazolta a finerenon vese- és kardiovaszkuláris kedvező hatását is. A finerenont már meglévő RAS-gátlás mellé adták. A klinikai és a saját adatok alapján mi a jelölt véleménye az ACEI+MRB vagy az ARB+MRB kombinációs kezelés DKD-ban történő alkalmazásáról? Továbbá, lehet-e a jövőben eme kombinációkat preferálni depressziós betegek esetében?

Ami a dapagliflozin és a RAAS-gátlók együttadásának a kérdését illeti, amit a jelölt a 143. oldalon taglal, egyszerűnek tűnik a válasz, hiszen a nagy klinikai tanulmányok (EMPA-REG OUTCOME, CANVAS Program, DECLARE-TIMI58, DAPA-HF, DAPA-CKD, stb.) mindegyikében a betegek igen nagy része szedett RAAS-gátlót, így tehát ezek az RCT-k, ebből a szempontból kombinációs kezelésű vizsgálatnak tekintendők. A kérdés talán inkább úgy merül föl, hogy az SGLT-2-gátlók vajon hatékonyak maradnak-e akkor, ha esetleg kiterjedtebben alkalmazzuk az ACEI+MRB vagy ARB+MRB kezelést? Jelölt hogyan látja ezt a kérdést?

## **Összefoglaló vélemény**

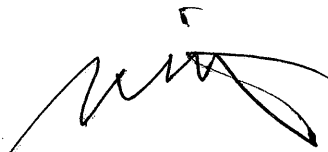
Jelölt disszertációja magas fokú ismereteket mutat a kísérletes kutatás területén. Kiváló in vitro és in vivo munkái számos, klinikailag jelentős területen hoztak fontos új eredményeket, amelyek egy része mára már a klinikai gyakorlatba is beépült.

## **Új felismerései:**

1. T1DM-modellben (streptozocin-diabetes) igazolta a szigma-1-receptor-brain-derived neurotrophic factor útvonal jelentőségét a depresszió kialakulásában.
2. Ebben a modellben igazolta a fluvoxamin kedvező hatását és így egyben a szigma-1-receptor szerepét.
3. Ugyanebben a modellben bemutatta az ACEI-k, az ARB-k és a MRB-k antidepresszáns hatását.
4. Bizonyította, hogy a RAAS-gátlók csökkentik a fehérjék O-GlcNacilációját.
5. Kimutatta, hogy a RAAS-gátlók a Na-K-ATP-áz kóros kompartmentalizációját javítják.
6. Leírta, hogy a dapagliflozin csökkenti a diabeteses tubuláris károsodást.
7. Igazolta, hogy a dapagliflozin csökkenti a hiperglikémia kiváltotta O-GlcNacilációt, a hipoxiát és a vesefibrózist.
8. Elsőként írta le a szigma-1-receptor differenciált expresszióját a vesében.
9. Bizonyította, hogy a szigma-1-receptor aktivációja csökkenti a DKD-s vesekárosodást.
10. Kimutatta, hogy a szigma-1-receptoragonista-kezelés védő hatású az iszkémia-reperfúziós károsodással szemben és így javíthatja a vesetranszplantáció sikerességét.

**A fentiek alapján Dr. Fekete Andrea MTA doktori értekezését alkalmasnak tartom nyilvános vitára és egyben, sikeres védelem esetén, javaslom számára az MTA doktori cím odaítélését.**

Pécs, 2021. 06. 29.



Prof. Dr. Wittmann István